

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
  - TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
  - FADED TEXT
  - ILLEGIBLE TEXT
  - SKEWED/SLANTED IMAGES
  - COLORED PHOTOS
  - BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
  - GRAY SCALE DOCUMENTS
- 

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

⑤1

Int. Cl. 2.

**C 08 G 65/00**

①9 **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

C 07 H 21/04

**DEUTSCHES PATENTAMT**



**DE 27 12 344 A 1**

①1

# **Offenlegungsschrift 27 12 344**

②1

Aktenzeichen: P 27 12 344.0-44

②2

Anmeldetag: 21. 3. 77

④3

Offenlegungstag: 28. 9. 78

③0

Unionspriorität:

③2 ③3 ③1 —

⑤4

**Bezeichnung:** Löslicher Komplexbildner für die affinitätsspezifische Trennung von makromolekularen Stoffen, Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung

⑦1

**Anmelder:** Müller, Werner, Prof. Dr.; Eigel, Antonin; Schuetz, Hans-Jürgen, Dr.; 4800 Bielefeld; Bünemann, Hans, Dr., 4803 Steinhagen

⑦2

**Erfinder:** gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 28 b PatG ist gestellt

**DE 27 12 344 A 1**

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Löslicher Komplexbildner für die affinitäts-  
spezifische Trennung von makromolekularen Stoffen,  
insbesondere Biopolymeren, wie Nukleinsäuren,  
g e k e n n z e i c h n e t d u r c h e i n l ö s -  
liches Polymeres, an das mindestens ein für das  
Biopolymere affiner Rest kovalent gebunden ist.
2. Komplexbildner nach Anspruch 1, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß er als lösliches  
Polymeres ein in Wasser und/oder organischen Lösungs-  
mitteln lösliches Polymeres umfaßt.
3. Komplexbildner nach Anspruch 1, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß er als Polymeres  
ein Polyäthylenglykol mit einem Molekulargewicht  
von 200 bis 40 000, ein Dextran oder ein lineares  
Polyacrylamid enthält.
4. Komplexbildner nach Anspruch 3, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß er ein Polyäthylen-  
glykol mit einem Molekulargewicht von etwa 6000  
enthält.
5. Komplexbildner nach einem der vorhergehenden An-  
sprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß der für das Biopolymere affine Rest durch Ver-  
esterung, durch Aufpfropfen oder durch Copolymeri-  
sation oder Copolykondensation an das lösliche  
Polymere gebunden ist.

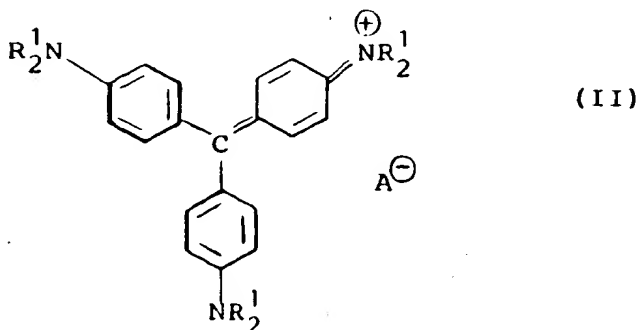
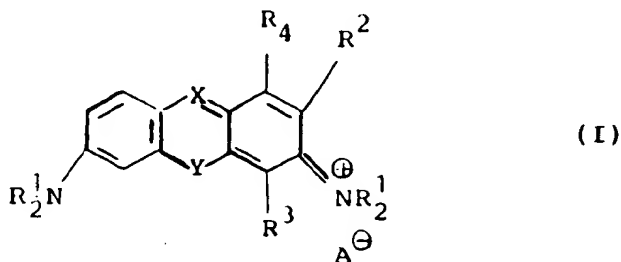
809839/0183

- 2 -

2712344

2.

6. Komplexbildner nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das lösliche Polymere als für das Biopolymere affinen Rest eine basenspezifische Gruppe für Nukleinsäuren trägt.
7. Komplexbildner nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß er als basenspezifische Gruppe für Nukleinsäuren den Rest eines Farbstoffs der folgenden allgemeinen Formeln I oder II trägt

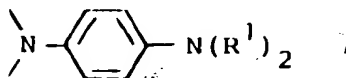


in welchen allgemeinen Formeln

X für eine CH-Gruppe oder ein Stickstoffatom,

Y für ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom,

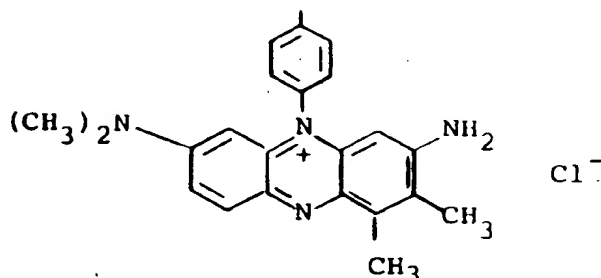
eine NH-Gruppe oder eine Gruppe der Formel



809877/0187

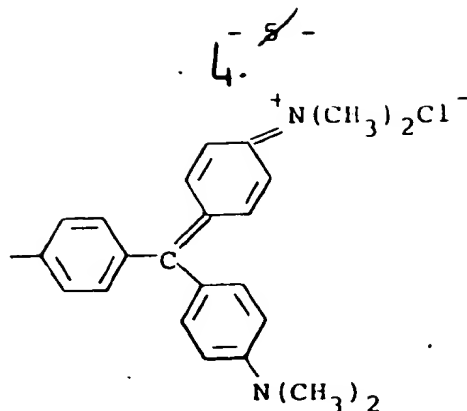
- $R^1$  unabhängig voneinander Wasserstoffatome oder Methylgruppen,  
 $R^2$  ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe,  
 $R^3$  ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe,  
 $R^4$  ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe und  
 $A^\ominus$  ein Anion, wie ein Chloridanion, ein Perchloratanion oder ein Oxalatanion bedeuten.

8. Komplexbildner nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß er als basenspezifische Gruppe den Rest von Malachitgrün, von Kristallviolett, von Methylgrün, von Auramin, des Farbstoffs Hoechst 33258, von Di-tert.-Butyl-proflavin, von Di-tert.-Butyl-acriflavin, von Diamidino-phenyl-indol (DAPI), von 1-Methylphenylneutralrot oder von Ethidiumbromid trägt.
9. Komplexbildner nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die basenspezifische Gruppe der folgenden Formel entspricht:



10. Komplexbildner nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die basenspezifischen Gruppe der folgenden Formel entspricht:

2712344



11. Verfahren zur Herstellung des Komplexbildners nach den Ansprüchen 1 bis 10, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man den für das Biopolymere affinen Rest über eine Gruppe an das lösliche Polymere bindet, die mit einer funktionellen Gruppe des löslichen Polymeren reagiert.  
5
12. Verfahren nach Anspruch 11, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man den für das Biopolymere affinen Rest durch Veresterung, durch Amidbildung, durch Urethanbildung, durch Aufpfpfen oder durch Copolymerisation oder Copolykondensation mit den für den Aufbau des löslichen Polymeren erforderlichen Ausgangsmaterialien an das lösliche Polymere bindet.  
10
13. Verfahren nach Anspruch 11, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man den eine Carboxylgruppe tragenden, für das Biopolymere affinen Rest durch Veresterung mit einer Hydroxylgruppe an Polyäthylenglykol oder Dextran bindet.  
15
14. Verfahren nach Anspruch 12, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man den eine copolymerisierbare Doppelbindung aufweisenden, für das Biopolymere affinen Rest durch Copolymerisation in lineares Polyacrylamid einbaut.  
20

809839/0183

15. Verfahren nach Anspruch 11, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man den für das  
Biopolymere affinen Rest nach der Bromcyanmethode  
an Dextran bindet.
- 5 16. Verfahren nach Anspruch 13, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Polyäthylen-  
glykol in einer Schmelzreaktion unter Verwendung  
von Imidazol als Katalysator in Gegenwart eines  
geeigneten Kondensationsmittels mit dem eine  
10 freie Carboxylgruppe tragenden, für das Biopolymere  
affinen Rest verestert.
17. Verfahren nach Anspruch 16, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man als Konden-  
sationsmittel Toluolsulfochlorid verwendet.
- 15 18. Verwendung der Komplexbildner nach den Ansprüchen  
1 bis 10 zur Auftrennung von Biopolymeren, insbe-  
sondere Nukleinsäuren, durch Zweiphasen-  
Affinitätsverteilung, durch Zweiphasen-Vertei-  
lungschromatographie oder durch Gelelektrophorese  
20 als Mittel zur Beeinflussung des Verteilungs-  
koeffizienten oder der Mobilität der Biopolymeren.
19. Verwendung nach Anspruch 18, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die  
Zweiphasen-Verteilungschromatographie in Gegen-  
25 wart von Cellulose als Trägermaterial durchführt.
20. Verwendung nach den Ansprüchen 18 oder 19 zur  
Auftrennung von Gemischen einsträngiger und/oder  
zweisträngiger Nukleinsäuren, insbesondere von  
DNA-Gemischen.



## TER MEER - MÜLLER - STEINMEISTER

D-8000 München 22

Triftstraße 4

D-4800 Bielefeld

Sickerwall 7

6.

21. März 1977

tM/th

Prof.Dr.Werner Müller, Rolandstraße 31,  
4800 Bielefeld

Antonin Eigel, Am Meierteich 15,  
4800 Bielefeld

Dr.Hans-Jürgen Schuetz, Geschwister Scholl Str.1,  
4800 Bielefeld

Dr.Hans Bünemann, Am Pulverbach 8,  
4803 Steinhagen

---

Löslicher Komplexbildner für die affinitäts-  
spezifische Trennung von makromolekularen  
Stoffen, Verfahren zu seiner Herstellung und  
seine Verwendung.

---

809839/0183

Prof.Dr.Werner Müller  
Antonin Eigel  
Dr.Hans-Jürgen Schuetz  
Dr.Hans Bünemann

---

Die vorliegende Erfindung betrifft einen löslichen Komplexbildner für die affinitätsspezifische Trennung von makromolekularen Stoffen, insbesondere Biopoly-  
5        meren, wie Gemischen aus einsträngigen und/oder zwei-  
strängigen Nukleinsäuren, insbesondere Desoxyribo-  
nukleinsäuren (im folgenden abgekürzt als DNA be-  
zeichnet), ein Verfahren zur Herstellung dieses Kom-  
plexbildners sowie dessen Verwendung.

Die Isolierung von einzelnen Genen oder von Sätzen  
10        gleicher Gene in repetitiver Anordnung aus dem Genom  
eukaryotischer Zellen ist nicht nur von rein wissen-  
schaftlichem Interesse, sondern im Hinblick auf die  
Gentechnologie auch von großer praktischer Bedeutung.  
Möglich waren solche Isolierungen nur dann, wenn sich  
15        die Basenzusammensetzung des Gens oder der Gengruppe  
mit ihren "Spacern" wenigstens 6 bis 7% von der  
mittleren Basenzusammensetzung des Gesamtgenoms  
unterschied. Als Trennverfahren wurden meist Cäsium-  
ionendichtegradientenzentrifugationen mit DNA-basen-  
20        spezifischen Zusätzen, wie Silber-, Quecksilber-  
oder Platinionen oder Actinomycin, Netropsin oder  
dem Farbstoff "Hoechst 33258" angewendet. Diese Ver-  
fahren haben nur beschränkte Kapazität, sind teuer  
und zeitraubend.

25        Die Entwicklung von Materialien zur Affinitäts-  
chromatographie von Biopolymeren hat in den ver-  
gangenen Jahren die Isolierung einer Vielzahl von

Biopolymeren stark vereinfacht oder ihre Reindarstellung überhaupt erst ermöglicht. Bei diesen Verfahren geht man in der Regel von einem Trägermaterial aus, das nach chemischer Aktivierung mit einer Substanz umgesetzt wird, die das zu isolierende Biopolymere möglichst spezifisch bindet. Aufgrund dieser Spezifität kann das gesuchte Biopolymere im Idealfall selektiv aus einem Gemisch ähnlicher Verbindungen an das Chromatographiematerial adsorbiert und anschließend unter geeigneten Bedingungen in reinem Zustand desorbiert werden (P.Cuatrecasas und C.B.Anfinsen, Ann.Rev.Biochem. 40 (1971) 259 bis 278).

Trotz der Fülle von Beispielen für die erfolgreiche Anwendung dieser Methode für eine Vielzahl von Biopolymeren konnte bislang kein Chromatographiematerial entwickelt werden, das eine ähnlich selektive und programmierbare Auftrennung auch für Nukleinsäuregemische ermöglicht. Eine hochauflösende Fraktionierung von Nukleinsäuregemischen im Grammaßstab ist aber eine Voraussetzung für die angesprochene Isolierung von einzelnen Genen oder von Sätzen gleicher Gene.

Bei den vorhandenen Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren mit niedrigem Molekulargewicht, zum Beispiel Transfer-Ribonukleinsäuren, wird die Auftrennung in die verschiedenen Spezies an Adsorbentien erreicht, die Ionenaustauschereigenschaften mit lipophilen Wechselwirkungen kombinieren (R.M.Kothari und V.Shankar, Journal of Chromatography 98 (1974) 449 bis 475). Dabei werden im wesentlichen die Wechselwirkungsmöglichkeiten des Trägers mit den seltenen Basen der Nukleinsäuren ausgenutzt, die in den verschiedenen Transfer-Ribonukleinsäuren in unterschiedlicher Menge vorhanden sind.

Da die höhermolekularen Ribonukleinsäuren und Desoxy-  
ribonukleinsäuren in der Regel keine seltenen Basen  
enthalten, können Methoden zu ihrer Auftrennung nur  
auf den folgenden Unterschiedsmerkmalen aufgebaut

5

werden:

- a) Verhältnis von Einzel- zu Doppelstrang
- b) Unterschiede in der Basenzusammensetzung
- c) Unterschiede in der Basensequenz
- d) Unterschiede in den Molekulargewichten
- e) Unterschiede in den Tertiärstrukturen.

10

All diese Merkmale werden tatsächlich bei den heute  
üblichen Fraktionierungsmethoden genutzt (R.M.Kothari,  
Chromatog.Rev.12 (1970) 127 bis 155).

15

Bei der wirksamsten Methode, der Fraktionierung im  
Salzgradienten in der Ultrazentrifuge führen Unter-  
schiede gemäß b, c und e zu Unterschieden in der  
Schwebedichte für die einzelnen DNA-Spezies, die  
durch Zusatz von basenspezifischen Substanzen noch  
vergrößert werden können. Die Trennschärfe nimmt mit  
abnehmendem Molekulargewicht, die Kapazität mit zu-  
nehmendem Molekulargewicht ab. Bei der Adsorptions-  
chromatographie an Hydroxyapatit erfolgt die  
Fraktionierung im wesentlichen gemäß a und nur in  
geringerem Ausmaß gemäß b, indem Guanin-Cytosin-  
reichere Nukleinsäuren schon bei etwas geringeren  
Salzkonzentrationen desorbiert werden als die Adenin-  
Thymin-reicheren Komponenten (W.Pakroppa und W.Müller,  
Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 171 (3) (1974) 699 bis 703).

20

25

30

Ganz analog können doppelsträngige Nukleinsäuren auch  
an spezifischen Protein-Kieselgur-Adsorbentien (zum  
Beispiel Methyl-Serum-Albumin-Kieselgur) gemäß Unter-  
schieden der Basenzusammensetzung fraktioniert werden,

- wobei wieder die Guanin-Cytosin-reicheren DNA-Spezies zuerst eluiert werden (J.D.Mandell und A.D.Hershey, Analytical Biochemistry 1 (1960) 66 bis 77; N.Sueoka und Ts'ai-Ying Cheng, J.Mol.Biol. 4 (1962) 161 bis 172). Die eigentliche Wirkungsweise dieser mehr zufällig entdeckten Adsorbentien ist nicht bekannt. Daher konnte die geringe Trennschärfe dieser Materialien trotz aller Bemühungen bis heute nicht grundsätzlich verbessert werden.
- 10 Erst in den letzten Jahren wurden bei der systematischen Untersuchung von zahlreichen Substanzen, die mit Nukleinsäuren Komplexe bilden, Verbindungen aufgefunden, die zu einer gezielten Synthese von Materialien für die Affinitätschromatographie
- 15 geeignet erschienen (W.Müller und D.M.Crothers, Eur.J.Biochem. 54 (1975) 267 bis 277; W.Müller, H.Bünemann und N.Dattagupta, Eur.J.Biochem. 54 (1975) 279 bis 291 und W.Müller und F.Gautier, Eur.J.Biochem. 54 (1975) 385 bis 394). Welche Vorteile die Anwendung
- 20 derartiger gut untersuchter Substanzen bei der Trennung von Nukleinsäuregemischen bringt, konnte bereits an den Beispielen der kombinierten Anwendung von Hydroxyapatit und Ethidiumbromid als basenspezifischem Zusatz zur Trennung von superhelicaler und helicaler
- 25 DNA (W.Pakroppa, W.Goebel und W.Müller, Analytical Biochemistry 67 (1975) 372 bis 383) und von Hydroxyapatit in Kombination mit Phenylneutralrotderivaten als basenspezifischen Komplexbildnern bei der Trennung von doppelsträngigen DNA-Spezies demonstriert werden
- 30 (W.Pakroppa und W.Müller, Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 71 (3) (1974) 699 bis 703).

Das Auflösungsvermögen dieser zuletzt erwähnten Methoden ist mit dem eines präparativen Cäsiumchlorid-Dichtegradienten vergleichbar, das heißt DNA-Frak-

tionen mit Unterschieden im (G + C)-Gehalt von  $>10\%$  (wobei G für Guanin und C für Cytosin stehen) lassen sich voneinander trennen. Trotz hoher Kapazität hat das Verfahren den Nachteil, daß sich DNA-Gemische mit  
5 einem mittleren Molekulargewicht der Komponenten von mehr als  $20 \times 10^6$  nicht mehr gut handhaben lassen und daß der als Adsorbens verwendete spezielle Hydroxyapatit selbst hergestellt werden muß.

Seit längerem ist bekannt, daß sich Nukleinsäure-  
10 Gemische im Polyäthylenglykol-Dextran-System unter bestimmten Bedingungen in RNA und einsträngige DNA einerseits und doppelsträngige DNA andererseits auf-  
trennen lassen. Dabei reichert sich die doppel-  
15 strängige DNA stets in der (leichteren) Polyäthylenglykolphase an, das heißt sie besitzt einen höheren Verteilungskoeffizienten als einsträngige Nukleinsäuren. Die Absolutwerte der Verteilungskoeffizienten lassen sich zwar durch Zusätze von Kalium- und  
Lithiumsalzen über rd. 3-4 Zehnerpotenzen variieren,  
20 eine Fraktionierung nach der Basenzusammensetzung gelingt in diesen Systemen jedoch nicht.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht nun darin, einen löslichen Komplexbildner bereitzustellen, mit dem gezielt der Verteilungskoeffizient oder  
25 die Mobilität von Biopolymeren affinitätsspezifisch verändert werden kann, so daß eine basenspezifische Trennung von Biopolymeren und insbesondere von Gemischen aus einsträngigen und/oder zweisträngigen Nukleinsäuren, insbesondere von DNA-Gemischen bei  
30 hoher Kapazität erreicht werden kann.

Es hat sich nunmehr gezeigt, daß diese Aufgabe mit einem löslichen Komplexbildner gelöst werden kann, der ein lösliches Polymeres umfaßt, an das

mindestens ein für das Biopolymere affiner Rest chemisch gebunden ist.

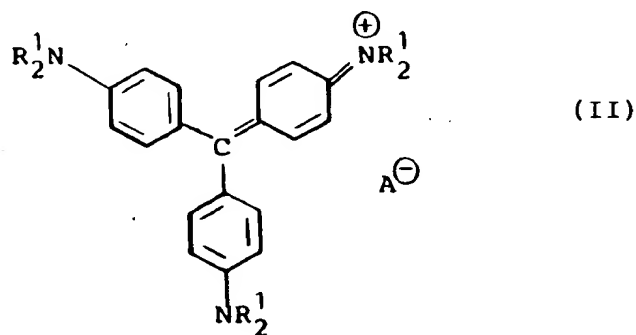
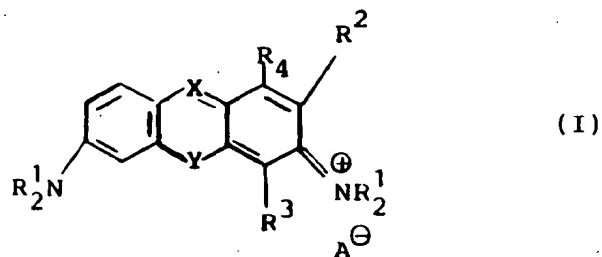
So hat es sich gezeigt, daß man die Verteilung von Nukleinsäuren unter Verwendung solcher löslicher Komplexbildner stark beeinflussen kann, wenn die Komplexbildner einen stark von 1 abweichenden Verteilungskoeffizienten besitzen. Dies ist bei niedermolekularen Verbindungen im Polyäthylenglykol/Dextran-System kaum anzutreffen, läßt sich aber erfindungsgemäß leicht dadurch herbeiführen, daß man den niedermolekularen, für das Biopolymere affinen Rest kovalent an geeignete Polymere bindet, vorausgesetzt, daß der für das Biopolymere affine Rest dabei seine Affinität nicht einbüßt. Verteilungskoeffizienten mit einem Wert von wesentlich größer als 1 erzielt man erfindungsgemäß durch Bindung an Polyäthylenglykol (am einfachsten durch eine Veresterungsreaktion), während Verteilungskoeffizienten mit einem Wert von wesentlich kleiner als 1 dadurch erreicht werden können, daß man den für das Biopolymere affinen Rest entweder an Dextran bindet (nach der Bromcyanmethode oder durch Veresterung) oder in lineares Polyacrylamid einbaut. Ist der für das Biopolymere affine Rest basen- oder sequenzspezifisch und bleibt diese Eigenschaft nach der Bindung an das Polymere erhalten, so lassen sich Guanin-Cytosinreiche bzw. Adenin-Thymin-reiche Nukleinsäuren sehr effektiv in der oberen bzw. der unteren Phase des Verteilungssystems anreichern.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein löslicher Komplexbildner für die affinitätsspezifische Trennung von makromolekularen Stoffen, insbesondere Biopolymeren, wie Nukleinsäuren, der gekennzeichnet ist durch ein lösliches Polymeres, an das mindestens ein für das Biopolymere affiner Rest kovalent gebunden ist.

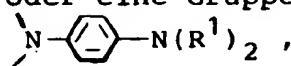
Als lösliches Polymeres enthält der erfindungsgemäße Komplexbildner vorzugsweise ein in Wasser und/oder orga-

nischen Lösungsmitteln lösliches Polymeres, wie ein Polyäthylenglykol mit einem Molekulargewicht von 200 bis 40 000, vorzugsweise mit einem Molekulargewicht von etwa 6000, ein Dextran mit einem  $\bar{M}_w$  von  $3 \cdot 10^3 - 3 \cdot 10^6$  oder ein lineares Polyacrylamid mit einem Polymerisationsgrad von 200 - 300 (MG 14 000 - 21 000). Im Prinzip sind sämtliche wasserlöslichen, Hydroxylgruppen tragenden Polymeren geeignet. An das lösliche Polymere ist als für das Biopolymere affiner Rest vorzugsweise eine basenspezifische Gruppe für Nukleinsäuren gebunden. Diese Bindung kann durch Veresterung, durch Aufpropfen oder durch Copolymerisation oder durch Copolykondensation erreicht worden sein.

Als für das Biopolymere affine Reste können basenspezifische Gruppen verwendet werden, die in den genannten Literaturstellen beschrieben sind. Insbesondere sind Reste von Farbstoffen der folgenden allgemeinen Formeln I und II



- in welchen allgemeinen Formeln
- X für eine CH-Gruppe oder ein Stickstoffatom,
- Y für ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine NH-Gruppe oder eine Gruppe der Formel





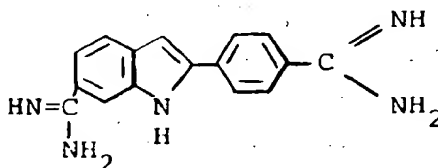
2712344

- 14 -

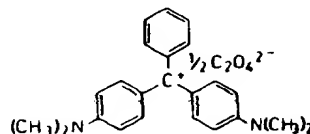
- $R^1$  unabhängig voneinander Wasserstoffatome oder Methylgruppen,  
 $R^2$  ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe,  
 $R^3$  ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe,  
 5  $R^4$  ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe  
 und  
 $A^\ominus$  ein Anion, wie ein Chloranion, ein Perchlorat-anion oder ein Oxalatanion  
 bedeuten, geeignet.

- 10 Erfindungsgemäß besonders bevorzugte, an das polymere Trägermaterial gebundene basenspezifische Komplexbildner sind die Reste der folgenden Farbstoffe:

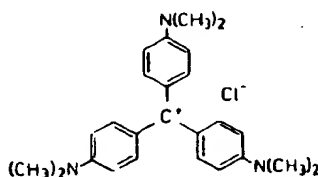
1. Diamidino-phenyl-indol (DAPI)



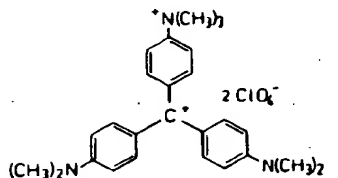
2. Malachitgrün



3. Kristallviolett

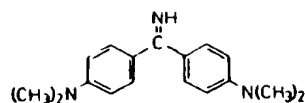


4. Methylgrün

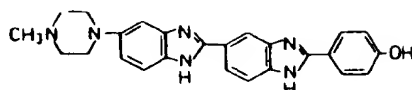


809839/0183

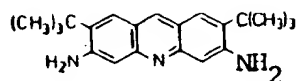
## 5. Auramin



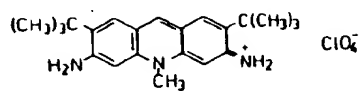
## 6. Farbstoff Hoechst 33258



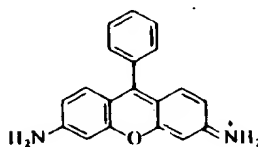
## 7. Di-tert.-butyl-proflavin



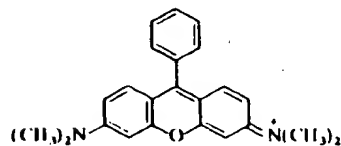
## 8. Di-tert.-butyl-acriflavin



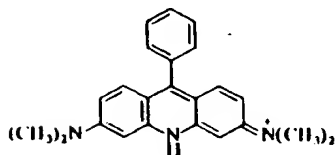
9.



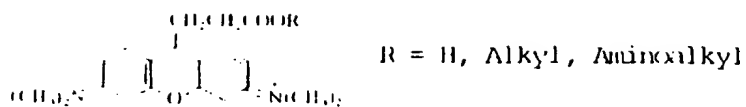
10.



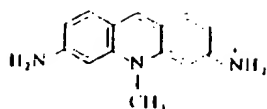
11.



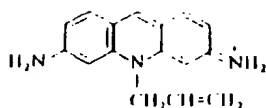
12.



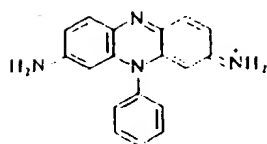
13.



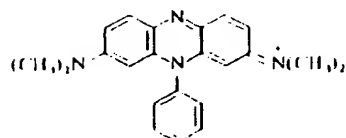
14.



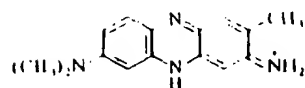
15.



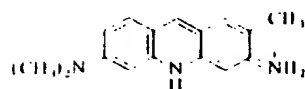
16.



17.



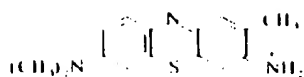
18.



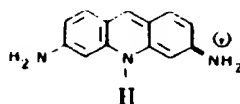
809839/0183

2712366

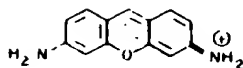
19.



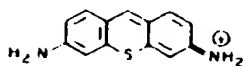
20. Proflavin



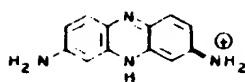
21.



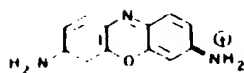
22.



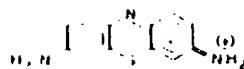
23.



24.



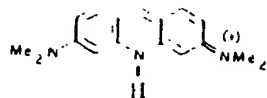
25. Thionin



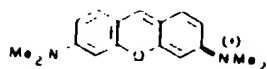
800310/0183

271256

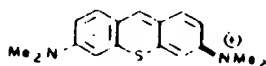
26. Acridinorange



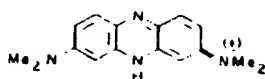
27. Pyronin G



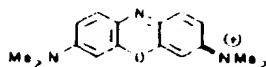
28. Thiopyronin



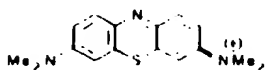
29.



30.



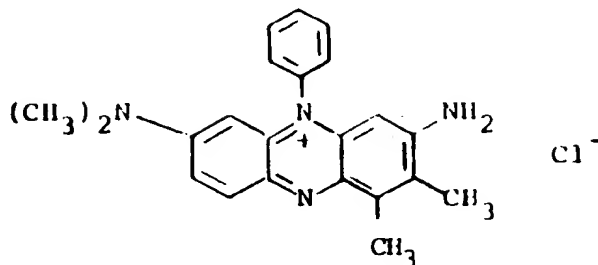
31. Methylenblau



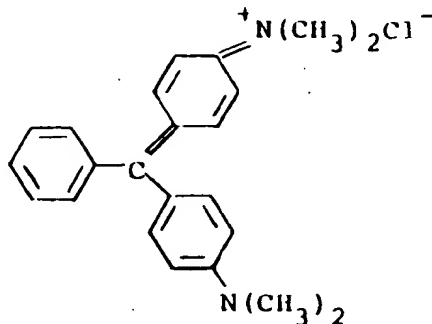
wobei in den obigen Formeln Me für die Methylgruppe steht.

0098110181

Die erfindungsgemäß bevorzugtesten basenspezifischen Gruppen sind jedoch die Reste von Phenylneutralrot der Formel



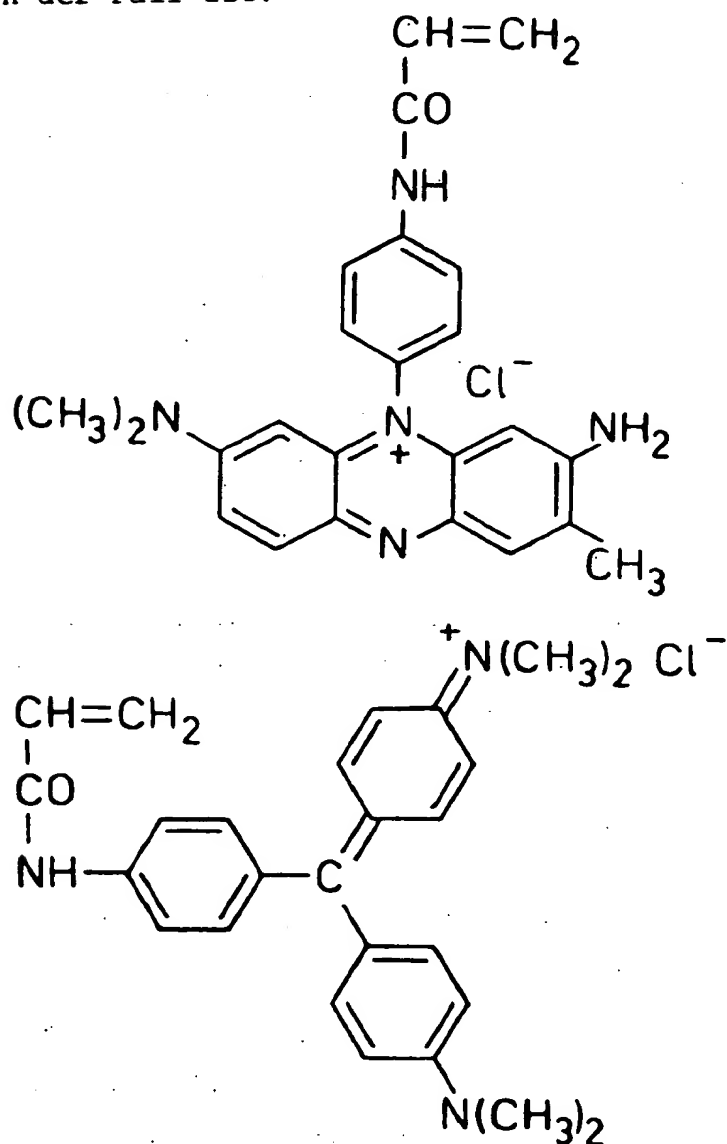
und Malachitgrün der Formel



- 5 Diese Farbstoffe sind an sich bekannt und im Handel  
erhältlich oder können nach Verfahrensweisen herge-  
stellt werden, die dem Fachmann geläufig und beispiels-  
weise in den oben erwähnten Veröffentlichungen von  
W.Müller und D.M.Crothers (Eur.J.Biochem. 54 (1975) 267  
10 bis 277), W.Müller, H.Bünemann und N.Dattagupta  
(Eur.J.Biochem. 54 (1975) 279 bis 291) und W.Müller  
und F.Gautier (Eur.J.Biochem. 54 (1975) 385 bis 394)  
beschrieben sind.

- 15 Diese basenspezifischen Gruppen bzw. Farbstoffreste  
können nach Methoden, die dem Fachmann ohne weiteres  
geläufig sind, kovalent an das lösliche Polymere ge-  
bunden werden, beispielsweise durch Veresterung mit an  
dem Polymeren vorhandenen Hydroxylgruppen (Poly-  
äthylenglykol bzw. Dextran) über in das Farbstoff-  
20 molekül eingeführte Carboxylgruppen, durch Amid-

- 5 bildung, durch Urethanbildung oder auch durch Copolymerisation in Abwesenheit und vorzugsweise in Gegenwart von anderen copolymerisierbaren Monomeren über copolymerisierbare Doppelbindungen, die in das Farbstoffmolekül eingeführt sind, beispielsweise eine Acrylamidgruppe, wie es für die erfindungsgemäß bevorzugten basenspezifischen Farbstoffderivate Acrylphenylneutralrot und Acrylmalachitgrün der folgenden Formeln der Fall ist.



Diese basenspezifischen Farbstoffderivate können von dem Fachmann in an sich bekannter Weise durch Einführen des Acrylrestes in die genannten Farbstoffmoleküle hergestellt werden. Dies gilt auch für die weiter oben  
5 genannten Farbstoffmoleküle.

Erfindungsgemäß verwendet man als lösliches Polymeres vorzugsweise ein unvernetztes und in Wasser oder organischen Lösungsmitteln lösliches oder quellbares Polymeres, wie ein Polyäthylenglykol mit einem Molekulargewicht von 200 bis 40 000, bevorzugter mit einem Molekulargewicht von 6000, ein Dextran mit einem  $\bar{M}_w$  von  $3 \cdot 10^3$  -  $3 \cdot 10^6$  oder ein lineares Polyacrylamid mit einem Polymerisationsgrad von 200 - 300. Diese Polymeren zeigen keine starken Wechselwirkungen mit den für das Biopolymere affinen Resten und insbesondere mit den basenspezifischen Gruppen für Nukleinsäuren.  
10  
15

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung der oben definierten löslichen Komplexbildner, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den für das Biopolymere affinen Rest über eine Gruppe an das lösliche Polymere bindet, die mit einer funktionellen Gruppe des löslichen Polymeren reagiert.  
20

So kann man den für das Biopolymere affinen Rest durch Veresterung, durch Amidbildung, durch Urethanbildung, durch Aufpfropfen oder durch Copolymerisation oder Copolykondensation mit den für den Aufbau des löslichen Polymeren erforderlichen Ausgangsmaterialien an das lösliche Polymere binden, wozu man übliche Reagenzien und übliche Verfahrensbedingungen anwendet, bzw. die für diese Reaktionen geeigneten Gruppen in das lösliche Polymere bzw. den für das Biopolymere affinen Rest einführt.  
25  
30

So kann man den eine Carboxylgruppe tragenden, für das Biopolymere affinen Rest durch Veresterung mit einer Hydroxylgruppe an Polyäthylenglykol oder Dextran binden oder man kann den eine copolymerisierbare Doppelbindung  
35



aufweisenden, für das Biopolymere affinen Rest durch Copolymerisation in lineares Polyacrylamid einbauen. Man kann auch den für das Biopolymere affinen Rest nach der Bromcyanmethode an Dextran binden.

- 5 Vorzugsweise führt man jedoch die Veresterung des eine freie Carboxylgruppe tragenden, für das Biopolymere affinen Rest mit Polyäthylenglykol mit Hilfe einer Schmelzreaktion durch, bei der man ein aliphatisches oder aromatisches tertiäres Amin, insbesondere Imidazol als Katalysator verwendet und in Gegenwart eines geeigneten Kondensationsmittels, beispielsweise in Gegenwart eines aromatischen Sulfonylchlorids, wie Toluolsulfonylchlorid, Diisopropylsulfonylchlorid oder Di-tert.-Butylsulfonylchlorid arbeitet. Weitere Beispiele für die Einführung der für
- 10 das Biopolymere affinen Gruppen durch Veresterung sind die Veresterung von Polyäthylenglykol 6000 mit p-Nitrobenzoesäure oder 4'-Carboxymalachitgrün (Chromgrün).

- Für den Einbau der für das Biopolymere affinen Reste in lineares Polyacrylamid geht man von den entsprechenden
- 20 Aminoderivaten der genannten Farbstoffe aus, die sich nach Überführen in die Acrylaminoderivate mit Acrylamid zu linearen Copolymeren copolymerisieren lassen. Der Einbau eines  $\beta$ -Alanylrestes zwischen die Aminofunktion und die Acrylgruppe ist zwar für die DNA-Wechselwirkung
- 25 vorteilhaft, jedoch nicht unbedingt erforderlich.

- Mit Hilfe der erfindungsgemäßen löslichen Komplexbildner lassen sich Biopolymere wie Proteine, und insbesondere DNA-Gemische spezifisch komplexieren, da die für das Biopolymere affinen Reste sich hinsichtlich der Basen
- 30 (A, C, G bzw. T) bzw. der Basensequenz spezifisch an die Biopolymeren anlagern. Hierdurch kann eine spezifische Änderung der Eigenschaften der komplexierten Biopolymere in Lösung erreicht werden. So kann durch Komplexierung der Biopolymeren mit den erfindungsgemäßen löslichen Kom-
- 35 plexbildnern eine starke Veränderung der Verteilungskoeffizienten der komplexierten Biopolymeren erreicht werden, was zur Auftrennung ausgenützt werden kann.

Weiterhin läßt sich durch Komplexierung der Biopolymeren mit Hilfe der erfindungsgemäßen Komplexbildner der hydrodynamische Reibungswiderstand der Moleküle beeinflussen, was starke Mobilitätsänderungen mit sich bringt, die bei der Gelelektrophorese zur Trennung der Biopolymeren ausgenützt werden können.

Das Auflösungsvermögen für Nukleinsäuren, das mit Hilfe der erfindungsgemäßen löslichen Komplexbildner und insbesondere der auf der Grundlage von Polyäthylenglykol, bei der Zweiphasenverteilung oder bei der Gelelektrophorese erreicht werden kann, ist weit größer als man es bisher mit anderen Methoden erreichen konnte. Damit wird es möglich, die oben angesprochene Isolierung und Reindarstellung von Biopolymeren in einfacher und effektiver Weise zu erreichen.

Gegenstand der Erfindung ist daher auch die Verwendung der oben definierten löslichen Komplexbildner zur Auftrennung von Biopolymeren, insbesondere Nukleinsäuren durch Zweiphasen-Affinitätsverteilung, durch Zweiphasen-Verteilungschromatographie oder durch Gelelektrophorese, wobei die erfindungsgemäßen Komplexbildner als Mittel zur Beeinflussung des Verteilungskoeffizienten oder der Mobilität der Biopolymeren dienen.

Vorteilhafterweise verwendet man, wenn man eine Zweiphasen-Verteilungschromatographie mit Hilfe eines kontinuierlich arbeitenden Chromatographieprozesses durchführen will, Cellulose als Trägermaterial, die beispielsweise die schwerere, dextranreiche Phase des Verteilungssystems adsorptiv bzw. physikalisch bindet. Auf diese Weise kann man unter Verwendung von Cellulose sämtliche Verteilungsprozesse auf der Basis von wäßrigen Polymer-Polymer- bzw. Polymer-Salz-Systemen (siehe auch P.A. Albertson (1971) "Partition of Cells, Particles and Macromolecules" 2. Auflage, Almquist und Wicksell, Stockholm), insbesondere von Polyglykol-Dextran-Systemen in säulenchromatogra-

phische, vielstufige Verteilungsprozesse umwandeln.

Besonders gut geeignet sind die erfindungsgemäßen löslichen Komplexbildner für die Auftrennung von Gemischen einsträngiger und/oder zweisträngiger Nukleinsäuren, insbesondere von DNA-Gemischen.

Bei der Zweiphasen-Affinitätsverteilung, der Zweiphasen-Verteilungschromatographie und der Gelelektrophorese verwendet man übliche Grundmedien, beispielsweise Phosphatpuffer oder Trispuffer mit einer Konzentration von etwa 10 mmol/l, pH und einem pH-Wert im Bereich von 4,5 - 8, wobei man für die erfindungsgemäßen Komplexbildner, die als basenspezifische Gruppe den Rest von Malachitgrün enthalten, einen schwach sauren Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 bis 6 verwendet, beispielsweise einen 0,01 molaren Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,5 bis 6. Als Elutionsmittel benutzt man die mobile Phase, also die polyäthylenglykolreiche Phase, die Salze als Zusätze enthalten kann, vorzugsweise Alkalimetallsalze, wie Natriumchlorid, Natriumperchlorat, Lithiumperchlorat, Kaliumchlorid, Lithiumsulfat, Kaliumacetat etc. Mit Vorteil wendet man Konzentrationsgradienten mit abfallender oder ansteigender ( $\text{LiSO}_4$ ) Konzentration an.

Die für die Trennung optimalen Salzgradienten, ihre Bestandteile, Konzentrationen, pH-Werte und die dafür verwendeten Puffer können jedoch vom Fachmann ohne weiteres ermittelt werden.

Im folgenden sei die vorliegende Erfindung weiter anhand von Beispielen und unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen erläutert.

In den Zeichnungen zeigen:

5        Fig. 1 anhand von Kurven die Änderung der Verteilungskoeffizienten K mit der DNA-Basenzusammensetzung im Polyäthylenglykol-Dextran-System in Anwesenheit von GC-spezifischem, polyäthylenglykolgebundenem 1-Methylphenylneutralrot (KTSat = Kalbsthymus-DNA Satelliten);

10       Fig. 2A die 10-stufige Gegenstromverteilung von Kalbs-Thymus-DNA zur Abtrennung der GC-reichen Satellitenfraktion im Polyäthylenglykol-Dextran-System mit Polyäthylenglykol-1-methylphenylneutralrot;

15       Fig. 2B die 10-stufige Gegenstromverteilung der Satellitenfraktionen 8-10 von Fig. 2A zur Auftrennung in die Komponenten der Schwebedichten 1,714 und 1,723 (Cäsiumchlorid-Dichtegradient) im Polyäthylenglykol-Dextran-System in Anwesenheit von polyäthylenglykolgebundenem 1-Methylphenylneutralrot;

20       Fig. 3 die Zweiphasenchromatographie von drei bakteriellen DNA unterschiedlichen GC-Gehalts im Polyäthylenglykol-Dextran-System unter Zusatz von polyäthylenglykolgebundenem 1-Methylphenylneutralrot an Cellulose.

25       Fig. 4 zeigt die Zweiphasenchromatographie von Kalbs-Thymus-DNA im Polyäthylenglykol-Dextran-System mit polyäthylenglykolgebundenem 1-Methylphenylneutralrot an Cellulose.

30       Fig. 5 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese von drei bakteriellen Desoxyribonukleinsäuren in Anwesenheit von polyäthylenglykolgebundenem 1-Methylphenylneutralrot.

Fig. 6 zeigt das Ergebnis der zweidimensionalen Agarosegelelektrophorese in Anwesenheit von poly-

äthylenglykolgebundenem 1-Methylphenylneutralrot.

Beispiel 1

Herstellung von Polyäthylenglykol-1-methyl-4'-carboxy-phenylneutralrot-Halbestern

- 5     A) 1-Methyl-4'-carboxy-phenylneutralrot (1,2-Dimethyl-3-amino-5-(4'-carboxyphenyl)-7-dimethylamino-phenaziniumsalz)

Man löst 1,05 g N-Dimethylamino-anilin-dihydrochlorid in 50 ml Methanol und versetzt die Lösung in der angegebenen Reihenfolge mit 2 ml 2n-Chlorwasserstoffsäure, 0,62 ml 2,3-Dimethylanilin, 5 ml Acetatpuffer (1m an Natriumacetat und 1m an Essigsäure) und 20 ml 1/6m- Kaliumjodatlösung. Nach 7 bis 8 Minuten verdünnt man die tiefgrüne Lösung mit Methanol auf 220 ml und  
10     gibt 13,7 g p-Aminobenzoesäure zu. Nach dem Auflösen der Säure verdünnt man mit Wasser auf 320 ml, stumpft mit einer 2n-Natriumcarbonatlösung auf einen pH-Wert von 6,7 ab und erwärmt auf einer Heizplatte im Verlaufe von 30 Minuten unter Rühren auf 50°C. Bei dieser  
15     Temperatur gibt man weitere 10 ml 1/6m-Kaliumjodatlösung zu und erhitzt langsam unter Rühren zum Sieden. Bei einer Temperatur von etwa 70°C verfärbt sich das Reaktionsgemisch von Blau über Violett nach Rot. Das Gemisch wird auf 165 ml eingengt (Siedetemperatur = 78°C) und danach 12 Stunden bei 3 bis 4°C aufbewahrt.  
20     Das ausgeschiedene Material wird abgesaugt, mit etwas kaltem Wasser gewaschen und über Kaliumhydroxid im Vakuum getrocknet.

Das trockene Rohprodukt wird nach dem Pulverisieren  
30     in einer Soxhlet-Extraktionsvorrichtung mit etwa 350 ml Aceton 6 Stunden extrahiert, um die nicht-umgesetzte p-Aminobenzoesäure zu entfernen, worauf man den Rohfarbstoff mit 350 ml Methanol in der gleichen

Vorrichtung aus der Hülse löst. Nach dem Verdampfen des Methanols im Vakuum reinigt man den Rückstand chromatographisch an Polyamid (zum Beispiel SC6, < 0,07 der Firma Macherey und Nagel) in einem Chloroform/Benzol/Methanol/-Wasser-System (60/25/15/0,4, Volumen/Volumen). Das Eluat der Hauptzone wird bei einer Badtemperatur von 35°C im Vakuum zur Trockene eingedampft, worauf man den Rückstand aus reinem Äthanol oder n-Propanol umkristallisiert.

5

10 Ausbeute; Etwa 700 mg (was 36% der Theorie entspricht).

B) Veresterung von 1-Methyl-4'-carboxy-phenylneutralrot mit Polyäthylenglykol (6000 oder 10 000)

Man schmilzt 3 g Polyäthylenglykol (mit einem Molekulargewicht von 6000 oder 10 000) bei 80°C unter Rühren mit 3 g Imidazol zusammen und versetzt dann mit 50 mg des gemäß Stufe A erhaltenen 1-Methyl-4'-carboxy-phenylneutralrots. Nachdem sich der gesamte Farbstoff gelöst hat, gibt man 600 mg p-Toluolsulfonylchlorid hinzu und erhitzt die Schmelze weitere 8 bis 12 Stunden unter Feuchtigkeitsausschluß auf 90°C. Nach Ablauf dieser Zeit sind mehr als 90% des Farbstoffs umgesetzt.

15

20

Man löst die Schmelze in der Kälte in etwa 50 ml eines 0,01m-Natriumphosphatpuffers mit einem pH-Wert von 5,6. Nach 3 Stunden filtriert man bei 4°C und chromatographiert im gleichen Medium über chemisch vernetztem Dextran (Sephadex G25) zur Entfernung von nicht-umgesetztem Farbstoff, Imidazol und Toluolsulfonsäure. Das Eluat der Hauptzone bewahrt man im Dunkeln bei 3 bis 4°C auf.

25

30 Wenn das nicht-umgesetzte Polyäthylenglykol ebenfalls entfernt werden soll (was für die meisten Anwendungszwecke nicht erforderlich ist), so extrahiert man die Lösung mit Chloroform, verdampft das Chloroform im

Vakuum, löst den Rückstand in Wasser und adsorbiert den Ester an vernetztes Dextran (Sephadex G60 CM). Nach dem Auswaschen des Polyäthylenglykols mit Wasser wird der Ester mit Hilfe einer 1M-Kaliumchloridlösung desorbiert, worauf man das Eluat gegen einen Puffer mit einem pH-Wert von weniger als 7 dialysiert. Zur Gehaltsbestimmung der Lösung ermittelt man die optische Dichte der Lösung bei 555 nm in Anwesenheit von 2% Natriumdodecylsulfat. Der molare Extinktionskoeffizient des Esters beträgt in diesem Medium  $53\,000\text{ (Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$ .

### Beispiel 2

Zweiphasenaffinitätsverteilung von Gemischen doppelsegmentaler Desoxyribonukleinsäuren.

Setzt man einem System aus Polyäthylenglykol-6000 und Dextran-T500 mit abgestimmtem Kaliumchlorid- und Lithiumsulfat-Gehalt so viel polyäthylenglykolgebundenes 1-Methylphenylneutralrot (M-BNR-PEG-6000) zu, daß die Oberphase und  $4 \times 10^{-5}$  Mol des Farbstoffs pro Liter enthält, so lassen sich in diesem Gemisch unter Ausnutzung der in Fig. 1 wiedergegebenen Verteilungskoeffizienten Desoxyribonukleinsäuren verschiedener Basenzusammensetzung trennen bzw. stark anreichern. Das gleiche Ergebnis erzielt man, wenn man dem System anstelle des CG-spezifischen Phenylneutralrot-Derivats so viel AT-spezifisches Alanylacrylamino-malachitgrün-acrylamid-Copolymer (Ala-MG-Aa-Copol.) zusetzt, daß die Konzen-

tration des Farbstoffs in der Unterphase des Systems rund  $3 \times 10^{-5}$  Mol pro Liter beträgt.

5 In beiden Fällen lassen sich durch einen Verteilungsschritt Desoxyribonukleinsäuren mit  $\Delta$  (G+C)-Werten von 15 bis 20% mit mehr als 90%iger Reinheit in der Oberphase bzw. in der Unterphase anreichern. Beträgt der Unterschied in dem (G+C)-Gehalt nur 8%, so läßt sich eine Komponente in 80%iger Ausbeute mit einer Reinheit von mehr als 95% aus der Oberphase und die zweite Komponente mit einer Reinheit von 75 bis 80% aus der Unterphase gewinnen.

Die kombinierte Anwendung von GC- und AT-spezifischen Komplexbildnern ergibt noch bessere Ergebnisse.

15 Durch Anwendung des beschriebenen Verteilungssystems mit GC-spezifischem, polyäthylenglykolgebundenem 1-Methylphenylneutralrot in 10stufigen Gegenstromverteilungen lassen sich die GC-reichen Satelliten aus Kalbs-Thymus-DNA abtrennen (Fig. 2A) und unter veränderten Bedingungen in ihre Hauptkomponenten zerlegen (Fig. 2B).

### 20 Beispiel 3

Zweiphasenverteilungschromatographie von DNA-Gemischen

Die mehrstufige Verteilung von Stoffgemischen läßt sich immer dann zu einem chromatographischen Trennprozeß ausbauen, wenn es gelingt, für eine der beiden Phasen  
25 einen Träger zu finden, der die Phase genügend stark festhält.

Für das Polyäthylenglykol-Dextran-System sind bisher nur Kieselgur und Sephadex-Gele als Träger vorgeschlagen worden. Bei der Überprüfung dieser Angaben hat sich gezeigt, daß Kieselgur die Dextranphase zu wenig bindet,  
30 um sich für größere Trennsäulen zu eignen. Sephadex-gele sowie Agarose eignen sich wegen ihres unerwünschten



Molekularsiebeffektes nicht.

Sehr gut brauchbar erwies sich nun, Cellulosepulver, insbesondere entfetteter und mit Säure gewaschener Linters (beispielsweise das von der Firma Macherey und Nagel 2200 ff erhältliche Material). Nach ausreichender Vorquellung bindet 1 g dieser Cellulose rund 1 bis 1,2 ml der Unterphase eines Systems aus Polyäthylenglykol-6000 und Dextran T40 (mit einem mittleren Molekulargewicht von 42 000).

10 Präpariert man bei einer Temperatur von mehr als 26°C aus 10 g vorgequollener Cellulose (die zur Auftrennung von 1,5 mg eines DNA-Gemisches ausreicht) in der üblichen Weise eine 2-Phasenverteilungssäule, so lassen sich daran die in den Fig. 3 und 4 wiedergegebenen Auftrennungen durchführen.

Die Fig. 3 zeigt dabei die Zweiphasenchromatographie von drei bakteriellen Desoxyribonukleinsäuren unterschiedlichen G+C-Gehalts im System Polyäthylenglykol-Dextran unter Zusatz von polyäthylenglykolgebundenem 1-Methyl-phenylneutralrot an Cellulose. (Die Zonen um 12 und 20 ml Eluatvolumen rühren von Störungen durch überschüssigen Farbstoff bzw. überschüssiger Unterphase her.)

25 Die Fig. 4 zeigt die Zweiphasenchromatographie von Kalbs-Thymus-DNA im Polyäthylenglykol-Dextran-System mit polyäthylengebundenem 1-Methyl-phenylneutralrot (2,2 OD<sub>555</sub>/ml Oberphase) an Cellulose. Der Peak bei der Fraktion Nr. 20 enthält die GC-reichen Satelliten, während der Peak zwischen den Fraktionen 40 und 50 eine GC-ärmere DNA-Fraktion mit der Schwebedichte 1,705 im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten enthält. Der Peak zwischen den Fraktionen 67 und 93 enthält die sogenannte "main-Band"-DNA.

Wenn sich die Komponenten des DNA-Gemisches um mehr als 6% im GC-Gehalt unterscheiden, wird bei den obigen Zweiphasenverteilungen in der Oberphase ein  $K^+-Li^+$ -Gradient angelegt, um eine genügend große Wanderungsgeschwindigkeit der GC- bzw. AT-ärmsten Komponenten zu erzielen.

Das Arbeiten bei Temperaturen von mehr als 26°C (die in den Fig. 3 und 4 dargestellten Läufe wurden alle bei 30°C durchgeführt) erwies sich als notwendig, da hierdurch eine genügend hohe Diffusionsgeschwindigkeit der DNA und eine genügend geringe Viskosität der Phasen gewährleistet wird.

#### Beispiel 4

Verwendung der erfindungsgemäßen polymergebundenen, basenspezifischen Komplexbildner bei der Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.

Nukleinsäuren lassen sich durch Elektrophorese in Polyacrylamid- oder Agarosegelen nach ihrer Molekülgröße auftrennen. Die kombinierte Anwendung von beiden Gelen erlaubt unter bestimmten Bedingungen auch eine mäßige Auftrennung nach der Basenzusammensetzung. Für eine vorzugsweise nach der Basenzusammensetzung erfolgende Auftrennung eignen sich niedermolekulare, basenspezifische Komplexbildner nicht, da der Effekt der partiellen Ladungsneutralisation auf die Mobilität des Polyelektrolyten im Spannungsfeld relativ klein ist. Setzt man dem Gel jedoch einen erfindungsgemäßen basenspezifischen Komplexbildner zu, so ergibt sich eine starke Mobilitätsveränderung bei GC- bzw. AT-reichen Desoxyribonukleinsäuren, und zwar in Abhängigkeit von der Spezifität des Komplexbildners.

Dieser Effekt läßt sich aus der starken Veränderung der hydrodynamischen Eigenschaften, die ein lineares Polymers durch die mit dem basenspezifischen Komplexbildner eingebrachten Verzweigungen erfährt, erklären.

In der Fig. 5 sind die Mobilitätsunterschiede von drei bakteriellen Desoxyribonukleinsäuren, die auf die gleiche mittlere Größe geschert worden sind ( $\bar{M}_w = 750\ 000$ ) in Agarose in Anwesenheit von polyäthylenglykolgebundenem 1-Methyl-phenylneutralrot (1,5 OD<sub>555</sub>/ml) gezeigt. Bei den bakteriellen Desoxyribonukleinsäuren handelt es sich um folgende Materialien:

- 1 : DNA aus *Cl. acidu urici*, 34% G+C;
- 2 : DNA aus *E. coli*, 52,5% G+C;
- 3 : DNA aus *M. luteus*, 72,5% G+C.

Die Fig. 5 stellt eine UV-Fluoreszenzphotographie nach dem Anfärben der Desoxyribonukleinsäure mit Ethidiumbromid dar.

Besteht das zu analysierende Nukleinsäuregemisch aus Komponenten verschiedener Größe, so führt man zweckmäßigerweise eine Vortrennung im Rundgel ohne Komplexbildner durch, bettet das Rundgel sodann in ein Flachgel mit Komplexbildner ein und betreibt eine Elektrophorese senkrecht zur ersten Auftrennungsrichtung. Besitzen alle Komponenten die gleiche Basenzusammensetzung, so wandern sie auf einer Geraden, die gegenüber der Richtung des eingebetteten Rundgels einen Winkel zwischen 0 und 90° bildet (siehe Fig. 6). Komponenten, die nicht auf dieser Geraden wandern, weisen eine von dem Mittelwert abweichende Basenzusammensetzung auf.

Ist der verwendete Komplexbildner GC-spezifisch, so sind raschere Komponenten AT-reicher und langsamere Komponenten GC-reicher als der Mittelwert.

- 5 Die Fig. 6 zeigt anhand einer UV-Fluoreszenzphotographie nach dem Anfärben der Desoxyribonukleinsäuren mit Ethidiumbromid die Auftrennung eines Eco-RI-Hydrolysats von  $\lambda$ -Phagen-DNA mit einem GC-spezifischen Komplexbildner. Dabei wurden die Fragmente zunächst  
10 im Rundgel in Richtung 1 der Größe nach aufgeteilt und anschließend in Richtung 2 im Flachgel in Anwesenheit des erfindungsgemäßen Adsorbens einer erneuten Elektrophorese unterworfen. Neben dem Auftreten einer normalerweise nicht sichtbaren Komponente zeigen etliche Fragmente deutliche Abweichungen von der Geraden.
- 15 Zusammenfassend ist festzustellen, daß die erfindungsgemäßen Komplexbildner hervorragend geeignet sind für die Trennung von makromolekularen Stoffen und insbesondere Biopolymeren, wie Nukleinsäuregemischen. Diese Komplexbildner lassen sich in einfacher Weise  
20 herstellen und in Bezug auf ihre Basenspezifität gezielt einstellen.

.39.  
2712344

Prof. Dr. Werner Müller

et al

Nummer:

27 12 344

Int. Cl.2:

C 08 G 65/00

Anmeldetag:

21. März 1977

Offenlegungstag:

28. September 1978

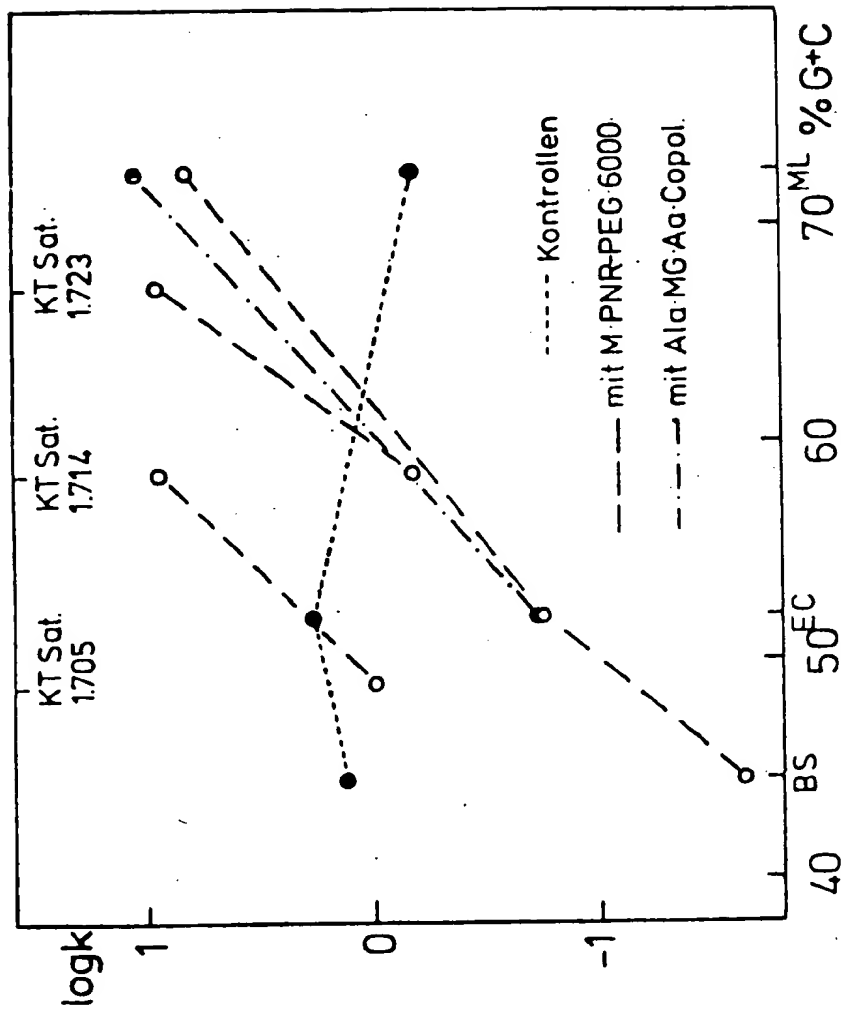
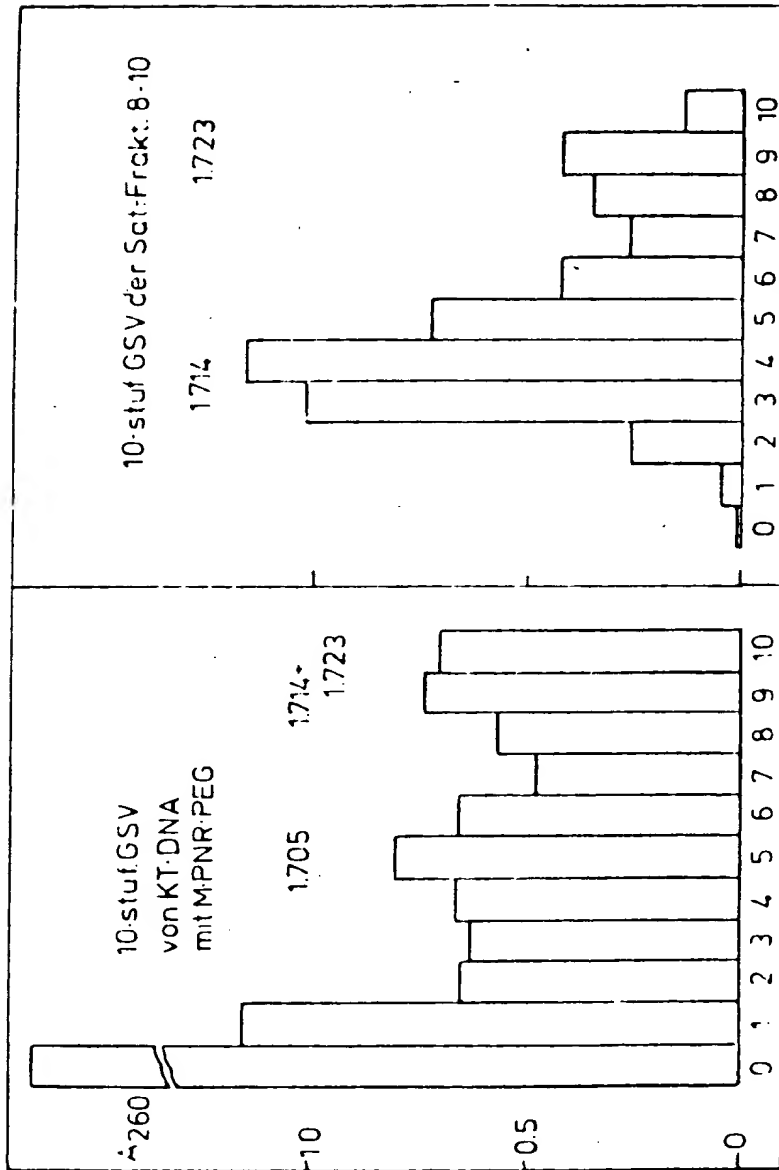


Fig. 1

809839/0183

2712344

34.



B

A

Fig. 2

2712344

. 35 .

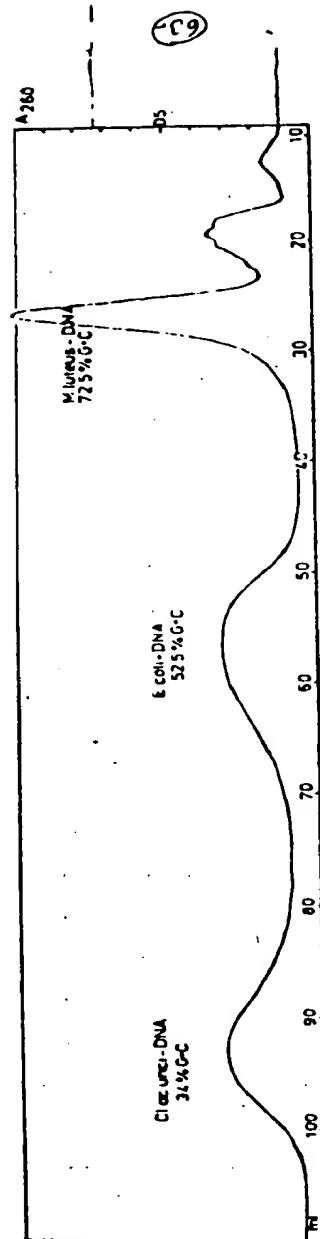
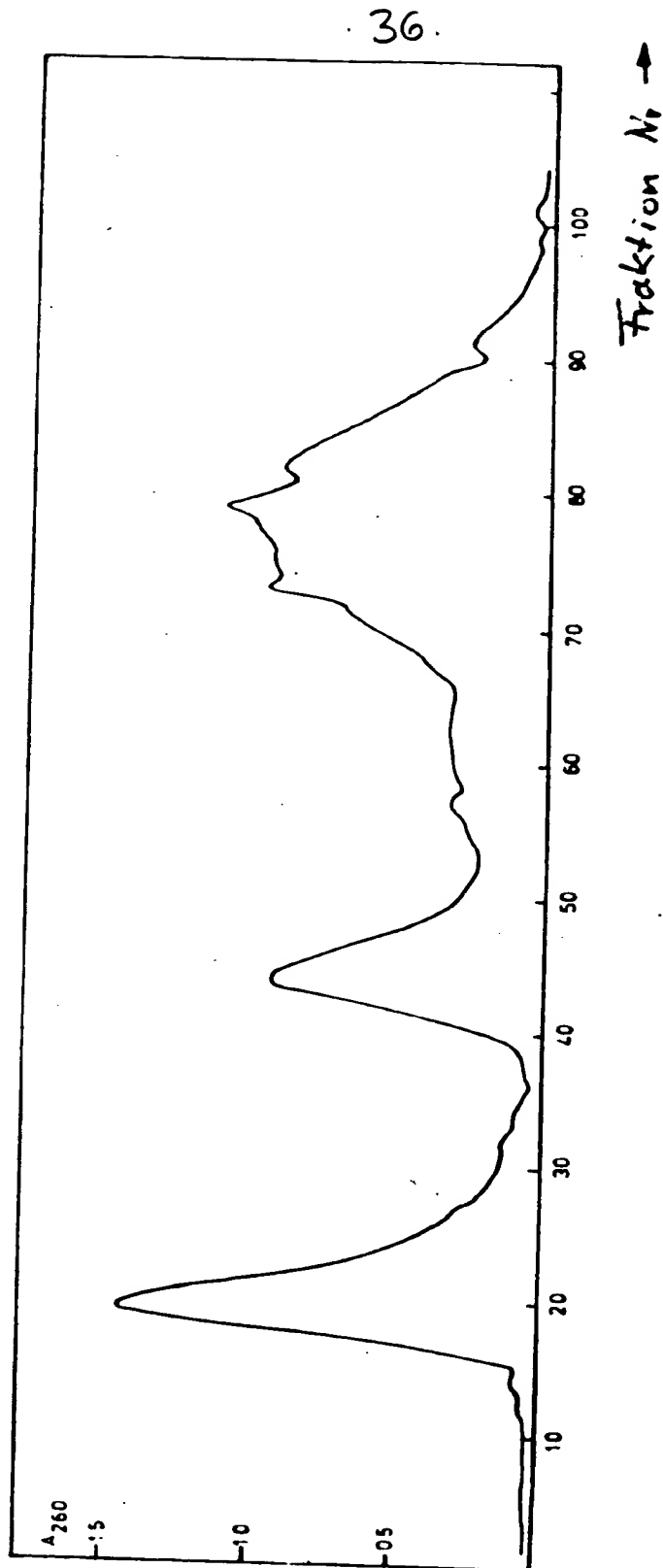


Fig. 3



2712344

Fig. 4



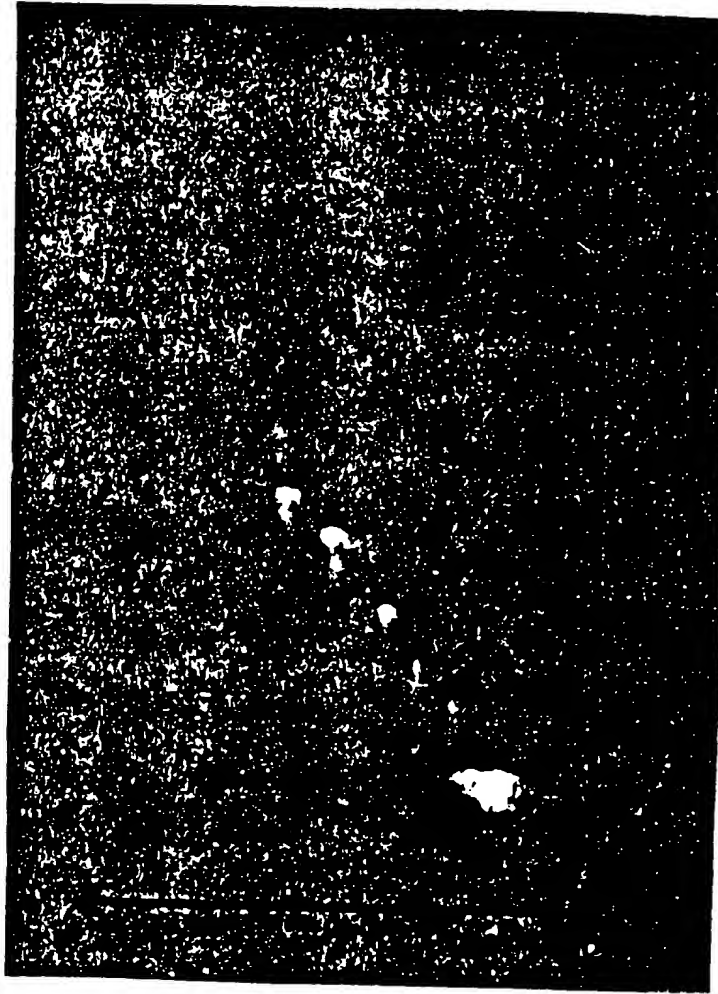
2712344

. 37.



*Fig. 5*

- 38 -



*Fig. 6*

809839/0183